

УДК: 576.324:612.111

Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. III. Влияние моновалентных анионов

С.В.Руденко¹, Л.Ши², В.А.Бондаренко¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
rsv@kharkov.ua

Исследовано влияние моновалентных анионов Cl^- , F^- , Br^- , I^- , NO_3^- и NO_2^- на последовательность изменения формы эритроцитов (морфологического ответа, МО) в изотонической сахарозной среде. Установлено, что МО, который состоит из трех фаз, протекает по-разному в средах, содержащих и не содержащих указанные анионы. Увеличение концентрации анионов от нуля до 20 мМ приводит сначала к ингибированию фазы 3 МО, а затем, последовательно, к ингибированию фаз 2 и 1, таким образом, что в итоге в средах с высокой концентрацией анионов (10 мМ и выше) МО полностью подавляется. Такое поведение характерно для всех анионов, кроме анионов I^- , которые ингибировали фазу 1 в меньшей степени по сравнению с другими. Эксперименты, в которых то же количество анионов добавляли к клеткам на разных стадиях МО, показали, что их эффект зависит от фазы МО, в которых находятся клетки в момент добавления аниона и его типа, хотя больших различий между анионами установлено не было. При добавлении анионов в конце фазы 3, на которой формируются стоматоциты, происходило медленное восстановление дискоидной формы клеток, при этом анионы йода также обладали наименьшей эффективностью. Полученные данные плохо согласуются с предположением, что наблюдаемые изменения формы эритроцитов обусловлены изменением конформации анионного обменника AE1, что может указывать на то, что МО является суперпозицией конформационных превращений в нескольких транспортных системах, одновременно активирующихся в данных условиях.

Ключевые слова: эритроциты, форма, морфологический ответ, низкая ионная сила, моновалентные анионы.

Морфологічна реакція еритроцитів на зміну електролітного складу середовища. III. Вплив моновалентних аніонів

С.В.Руденко, Л.Ши, В.А.Бондаренко

Досліджено вплив моновалентних аніонів Cl^- , F^- , Br^- , I^- , NO_3^- і NO_2^- на різні фази зміни форми еритроцитів (морфологічної відповіді, МВ) в ізотонічному сахарозному середовищі. Встановлено, що на характер перебігу МВ, яка складається з трьох фаз, впливає присутність або навпаки, відсутність в середовищі зазначених аніонів. Збільшення концентрації аніонів від нуля до 20 мМ призводить спочатку до інгібування фази 3 МВ, а потім до інгібування фаз 2 і 1, при цьому необхідно зазначити, що в середовищах з високою концентрацією аніонів (10 мМ і вище) МВ цілком нівелюється. Такий характер змін властивий для всіх аніонів, виключаючи аніони йоду, що викликали менш виражене інгібування фази 1 порівняно з іншими. При додаванні до клітин тієї ж кількості аніонів на різних стадіях МВ продемонстровано залежність ефекту від фази МВ і типу аніонів, незважаючи на відсутність виразних відмінностей між аніонами. У випадку додавання аніонів наприкінці фази 3, на якій формуються стоматоцити, відбувалося повільне відновлення дискоїдної форми клітин, при цьому аніони йоду також були найменш ефективні. Отримані дані не узгоджуються з припущенням, згідно з яким зміни форми у еритроцитів зумовлені зміною конформації анионного обмінника AE1, виходячи з чого можна припустити, що МВ є суперпозицією конформаційних перетворень у декількох транспортних системах, що активуються за даних умов.

Ключові слова: еритроцити, форма, морфологічна відповідь, низька іонна сила, моновалентні аніони.

Morphological response of erythrocytes on changes of electrolyte content of the medium. III. Effect of monovalent anions

S.V.Rudenko, L.Shi, V.A.Bondarenko

The effect of monovalent anions Cl^- , F^- , Br^- , I^- , NO_3^- and NO_2^- on dynamic of erythrocyte shape changes in sucrose media (morphological response, MR) was studied. It was established that triphasic MR had different time courses in media with and without anions. Increasing anion concentration from zero up to 20 mM results in inhibition in phase 3 first, followed by inhibition in phases 2 and 1 in such a manner that MR becomes fully eliminated in media containing anions at concentration more than 10 mM. This behavior was characteristic for all anions except iodide which was less effective compared to other anions. In experiments where the same amount of anions was added at

different phases of MR, the phase and anion type effects were observed, although the difference between anions was not pronounced. Addition of anions at the end of phase 3 where the cells were stomatocytes initiated slow retransformation toward discs, the iodide again being less effective. The data obtained are not consistent with the proposals as for the role of band 3 (AE1) conformation in MR, rather they suggest a possible involvement of conformation state of other ion transport systems which become active under present conditions.

Key words: *erythrocyte, shape, morphological response, low ionic strength, monovalent anions.*

Введение

В предыдущих работах было установлено, что наиболее распространенным типом реакции формы эритроцитов после их введения в изотоническую сахарозную среду с низким содержанием ионов хлора является трехфазная последовательность, состоящая из быстрой сферуляции (фаза 1), последующего восстановления дискоидной формы (фаза 2) и повторной сферуляции (фаза 3), которую мы обозначили как морфологический ответ (МО) (Руденко и др., 2007а, 2007б). Было показано, что различные фазы МО блокируются ингибиторами анионного транспорта и зависят от типа, концентрации и времени действия ингибиторов (Руденко и др., 2007а, 2007б). Эти данные указывают на взаимосвязь формы клеток с процессами ионного транспорта, которые постулируются в некоторых моделях регуляции формы эритроцитов (Gimsa, Ried, 1995; Wong, 1999). Между тем, факт влияния ингибиторов на форму клеток в среде с низкой ионной силой подтверждает такую связь лишь опосредованно, поскольку, во-первых, известно, что в этих условиях активируются и другие транспортные механизмы (Bennekou et al., 2004, 2006; Bernhardt et al., 1987, 1999; Frohlich et al., 1983; Jones, Knauf, 1985; Knauf et al., 1983; Sambasivarao et al., 1986), а во-вторых, показано, что ингибиторы анионного транспорта могут ингибировать не только обменные потоки анионов, но и нетто-потоки, природа которых и их связь с функционированием анионного обменника AE1 (белка полосы 3) еще окончательно не установлены (Frohlich et al., 1983; Jones, Knauf, 1985; Knauf et al., 1983). AE1 осуществляет связанный обмен внутриклеточных и внеклеточных анионов хлорида и бикарбоната (HCO_3) с высокой скоростью, но, кроме этого, может осуществлять обмен и других моновалентных и двухвалентных анионов (Chapman, Kuchel, 1990; Dalmark, Wieth, 1972; Gasbjerg, Brahm, 1991; Gasbjerg et al., 1996; Greco, Solomon, 1997; Wieth, 1970, 1979). Как правило, скорость обмена иных анионов значительно меньше скорости обмена хлорида (Chapman, Kuchel, 1990; Dalmark, Wieth, 1972; Wieth, 1970, 1979). Можно предположить, что если МО связан с функционированием анионного обменника, то замена анионов хлорида на другие моновалентные анионы должна отразиться на характере морфологических преобразований в средах, содержащих эти анионы, что может дать полезную информацию как относительно функционирования AE1 в средах с низкой ионной силой, так и его влияния на форму эритроцитов. Поэтому целью данной работы было изучение влияния анионов хлора, фтора, брома, йода, нитрата и нитрита на различные фазы МО эритроцитов в неэлектролитной среде.

Материалы и методы

Работу проводили на свежих эритроцитах человека, которые дважды отмывали в незабуференном физиологическом растворе (150 mM NaCl), а затем осадок разводили в 10 раз в изотоническом растворе HBS (150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7,4) и использовали как сток-суспензию. Для изучения изменений формы клеток во времени использовали двухканальный формометр-агрегометр ФА-01, который наряду с измерением оптической плотности (ОП), или светопропускания измеряет и флуктуации интенсивности светового потока, которые несут информацию о форме клеток. Индекс формы (ИФ) рассчитывали по протоколу, описанному ранее для определения формы эритроцитов (Руденко и др., 1998), и вычисляли по формуле $\text{ИФ} = k \cdot D$, где k – постоянный коэффициент, зависящий от коэффициента усиления сигнала и от калибровки прибора, а D – среднеквадратичное значение амплитуды флуктуаций светового потока, усредненное на временном интервале в 1 с. Калибровку прибора осуществляли установкой коэффициента k таким образом, чтобы ИФ, который отражает степень дискоидности (или сферичности) эритроцитов, был равен 1–1,2 для дисков. В этом случае значение ИФ для сфер имело значение 0,07. В цилиндрическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, содержащую 2 мл HBS, добавляли 7–9 мкл сток-суспензии эритроцитов таким образом, чтобы начальное значение ОП было в пределах $0,30 \pm 0,01$, что соответствует концентрации эритроцитов порядка $6 \cdot 10^6$ в 1 мл. Клеточная суспензия перемешивалась магнитной мешалкой со скоростью 600 об/мин. Динамика морфологических изменений изучалась при введении клеток в незабуференную среду 0,3 М сахарозы (Merck), pH 5,8, содержащую или не содержащую исследуемые анионы. В других случаях анионы добавляли непосредственно в кювету из концентрированных растворов до получения

заданной конечной концентрации. На рисунках представлены типичные данные, от 3 до 5 независимых экспериментов, проведенных с кровью различных доноров при комнатной температуре 20–22°C.

Результаты исследования

Когда эритроциты помещали в изотонический раствор сахарозы с низким содержанием хлоридов, наблюдались динамические изменения формы клеток. Эта морфологическая трансформация (морфологический ответ, МО) состоит из трех фаз: быстрой сферуляции (фаза 1), восстановления формы, близкой к дискоидной, (фаза 2) и последующей, более медленной вторичной сферуляции (фаза 3). Микроскопические наблюдения подтвердили, что клетки на фазе 2 имеют дискоидную форму, тогда как на фазе 3 они имеют форму стоматоцитов. МО представляет собой достаточно быстрый процесс, протекающий в пределах 1–3 мин с максимумом в интервале 20–40 с (рис. 1). Мы изучали влияние моновалентных анионов на все три фазы МО в нескольких постановках. В первом случае анионы в заданной концентрации добавляли в раствор сахарозы до клеток и изучали их влияние на ход МО. Во втором случае анионы добавляли на максимуме МО, чтобы установить их влияние на последующее развитие фазы 3. В третьем случае анионы добавляли через 150 с после клеток, т.е., фактически, после завершения процесса трансформации для исследования его обратимости.

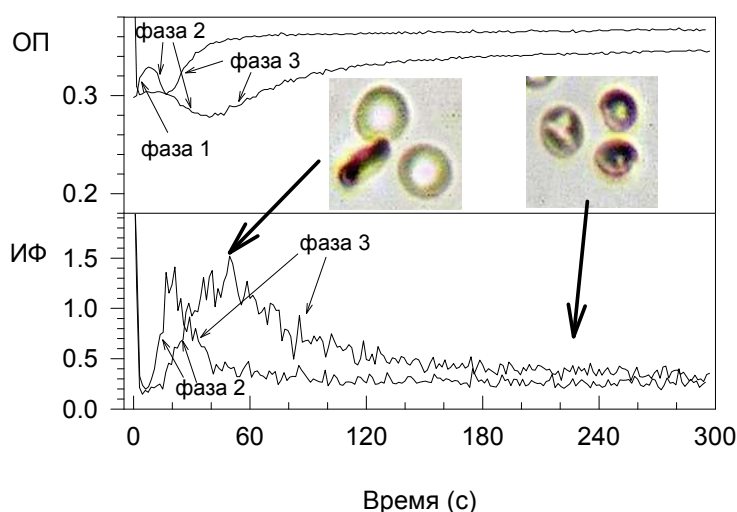


Рис. 1. Примеры характерных кривых изменения оптической плотности (ОП) и индекса формы (ИФ) эритроцитов во времени (морфологического ответа) после их введения в сахарозную среду (0,3 М). Каждая кривая соответствует полному отдельному эксперименту, включающему выделение эритроцитов двух доноров и приготовление новых растворов сахарозы

На рис. 2 показаны зависимости изменения ИФ на фазе 1 от концентрации анионов в сахарозной среде. Видно, что эти зависимости являются однотипными для всех анионов, кроме анионов йода, и характеризуются возрастанием ИФ по мере увеличения их концентрации. Эти данные показывают, что анионы ингибируют фазу 1 формотрансформации, т.е. предотвращают начальную сферуляцию клеток. В этом отношении анионы йода оказывают более слабый эффект по сравнению с другими анионами. На рис. 3 и 4 приведены аналогичные данные в отношении влияния анионов на фазу 3 МО в условиях, когда анионы изначально присутствовали в среде (рис. 3) и когда их добавляли на максимуме МО (рис. 4).

В обоих случаях зависимости имеют схожий характер, что свидетельствует в пользу того, что момент добавления анионов не имеет существенного значения для проявления ими блокирующего эффекта на эту фазу МО. Это подтверждается также и тем, что анионы йода немного отличаются от других тем, что при больших концентрациях снижают ИФ, что проявляется в обоих приведенных случаях. На рис. 5 показана динамика изменения ИФ в ходе МО и после того как анионы добавляли в конце фазы 3 МО. Видно, что это приводит к медленному восстановлению ИФ, которое также зависит от концентрации и вида анионов (рис. 6). Влияние анионов йода и в этом случае отличается от других анионов тем, что они менее эффективны в отношении восстановления ИФ и в их присутствии клетки не полностью восстанавливают дискоидную форму.

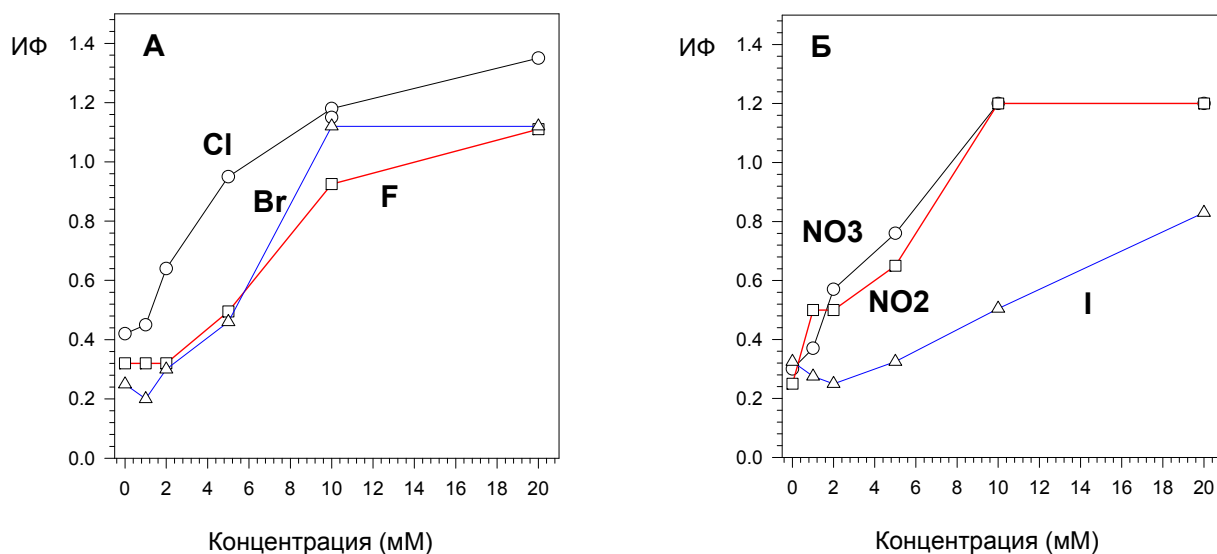


Рис. 2. Зависимость ИФ на фазе 1 МО от исходной концентрации анионов хлора, фтора и брома (А) и анионов йода, нитрата и нитрита (Б) в сахарозной среде

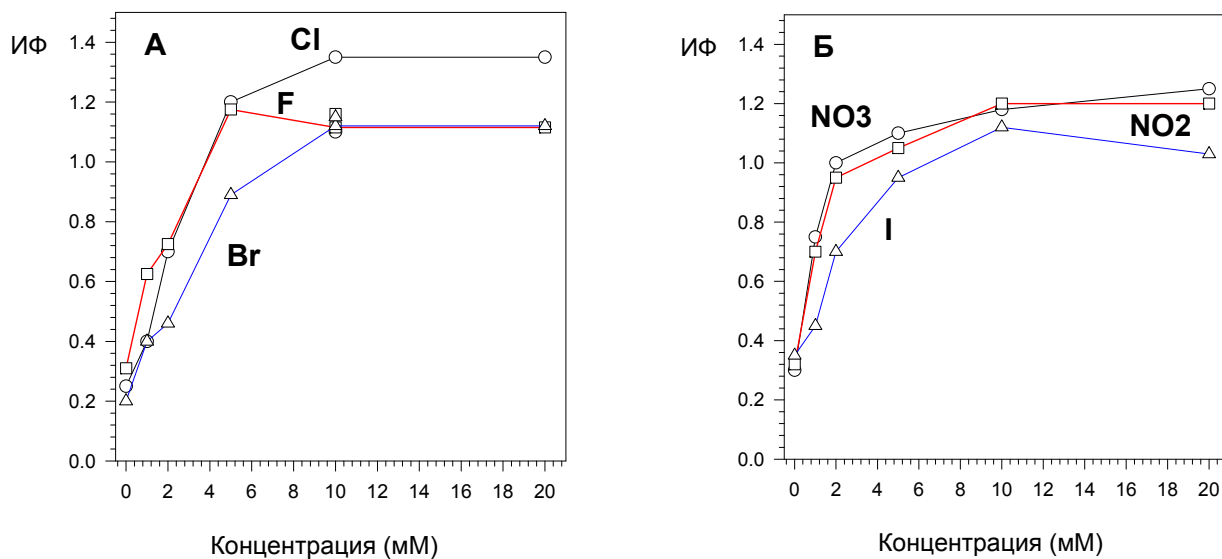


Рис. 3. Зависимость ИФ на фазе 3 МО, измеренного через 150 с после введения клеток в сахарозную среду, от исходной концентрации в ней анионов хлора, фтора и брома (А) и анионов йода, нитрата и нитрита (Б)

Приведенные данные показывают, что характер влияния анионов на все фазы МО является однотипным и проявляется в концентрационно-зависимом увеличении ИФ. Такой тип зависимости напоминает зависимости типа Михаэлиса-Ментен для скоростей ферментативных реакций или обменного потока анионов, катализируемого белком полосы 3 (AE1) мембраны эритроцитов в зависимости от концентрации субстрата (аниона) (Gasbjerg, Brahm, 1991; Gasbjerg et al., 1996; Wieth, 1979; Liu et al., 1996a). Используя такую аналогию, можно оценить константу диссоциации анионов в отношении различных фаз МО, т.е. ту концентрацию $K_{1/2}$, при которой ИФ имеет значение, равное половине от максимального. Полученные значения $K_{1/2}$ для разных анионов, вычисленные для одного донора, приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Кажущиеся константы диссоциации $K_{1/2}$ анионов для различных фаз морфологического ответа эритроцитов. Величины p даны по отношению к средней величине на фазе 1 (парный тест Стьюдента)

Условия	Анион (мМ)						Среднее \pm ст. откл.
	Cl^-	F^-	Br^-	NO_3^-	NO_2^-	I^-	
Фаза 1	5	6,4	6,4	4,4	4,4	10	$6,1 \pm 2,1$
Фаза 3	2,8	2	3,6	1,4	1,4	1,4	$2,1 \pm 0,91$ $p < 0,01$
Фаза 3 (max)	3	1,2	1,6	1	2	3,2	$2,0 \pm 0,9$ $p < 0,01$
Фаза 3 (150 с)	2,5	2,2	4	2,5	2,5	2,1	$2,6 \pm 0,7$ $p > 0,01$

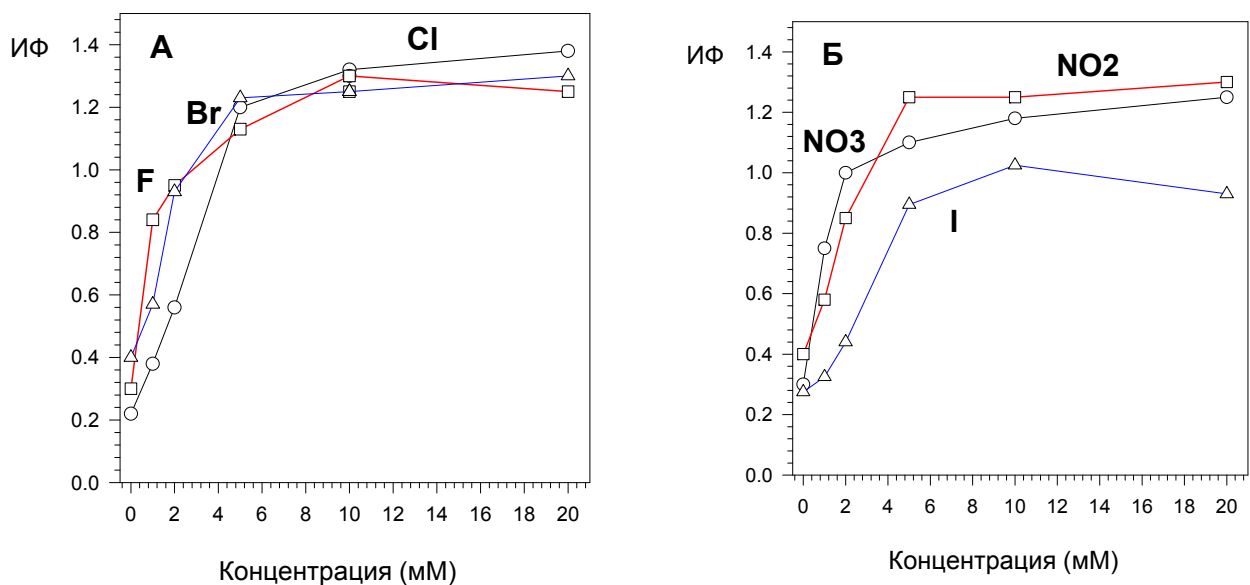


Рис. 4. Зависимость ИФ на фазе 3 МО, измеренного через 150 с после введения клеток в сахарозную среду, от концентрации в ней анионов хлора, фтора и брома (А) и анионов йода, нитрата и нитрита (Б) в условиях, когда анионы добавляли к эритроцитам на максимуме МО (~через 20с)

Нужно отметить, что как характер МО, так и конкретные значения констант могут варьировать от донора к донору, поэтому сравнительную оценку влияния анионов целесообразно проводить в эксперименте на одном образце крови. Как видно, константы диссоциации для различных анионов отличаются незначительно и находятся в интервале от 1 до 3 мМ для всех фаз МО, кроме фазы 1, для которой эти значения в 2–3 раза больше. Статистический анализ показывает, что достоверные различия наблюдаются между константами диссоциации для различных фаз процесса, а не между анионами. Так, для ингибирования фазы 1 нужна концентрация анионов, в три раза большая, чем для ингибирования фазы 3. Тем не менее, из данных, приведенных на рисунках, видно, что во многих случаях анионы йода отличаются от других по степени их влияния на форму клеток.

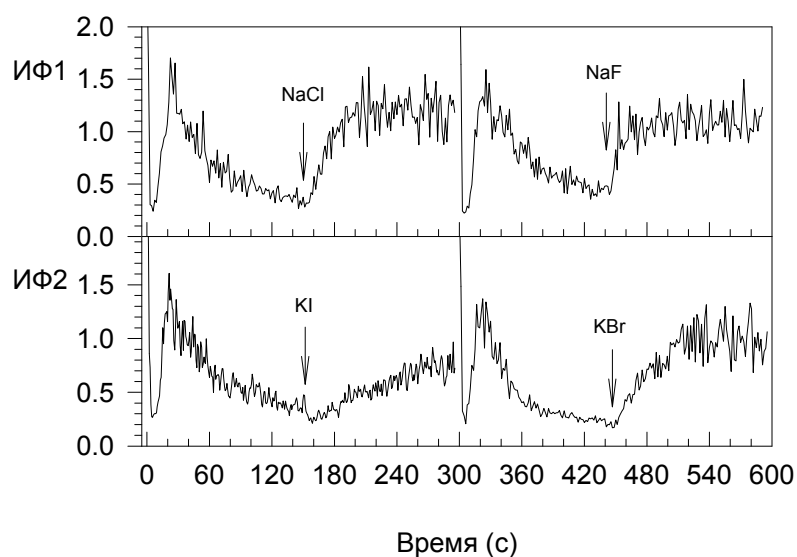


Рис. 5. Динамика изменений ИФ эритроцитов в ходе МО и после добавления к ним анионов. Стрелками показаны моменты добавления соответствующих анионов до конечной концентрации 10 мМ

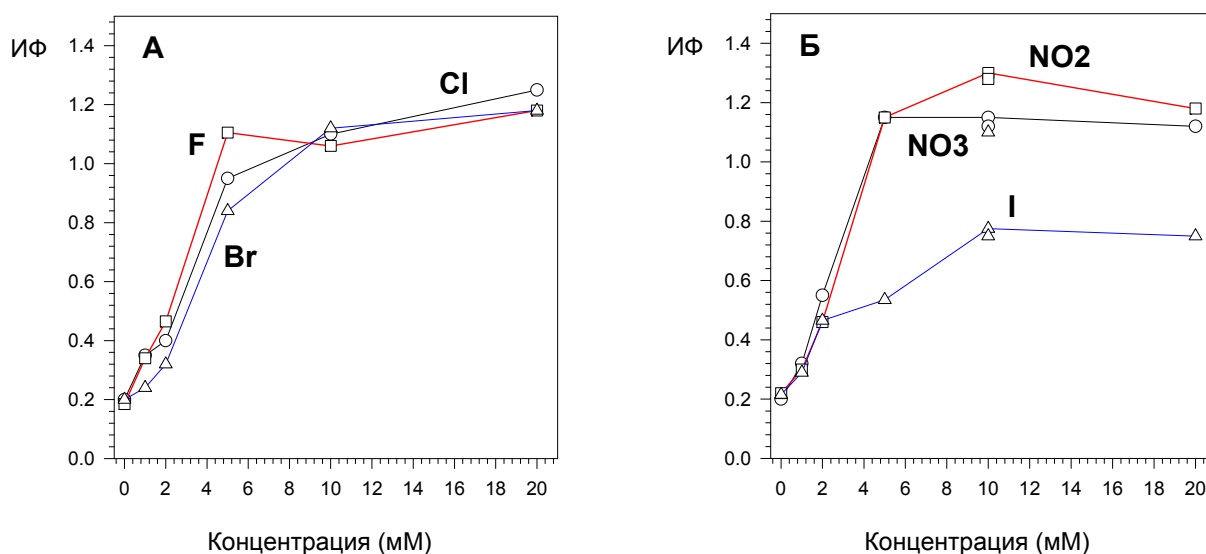


Рис. 6. Зависимость степени восстановления ИФ, измеренного через 150 с после добавления анионов, от их концентрации. Анионы хлора, фтора и брома (А) и анионы йода, нитрата и нитрита (Б) добавляли к клеткам через 150 с после введения клеток в сахарозную среду

Обсуждение

В настоящей работе рассматривается вопрос о том, в такой мере изменение формы эритроцитов в ходе МО может быть связано с функционированием системы их анионного транспорта. Такая связь, фактически, постулируется в некоторых моделях формотрансформации (Gimsa, Ried, 1995; Wong, 1999). Существуют также экспериментальные данные, показывающие, что для эхиноцитов поверхностная площадь белков внешнего монослоя больше, чем для дискоцитов и, наоборот, меньше для стоматоцитов (Betz et al., 2007). Это можно рассматривать как подтверждение идеи, что текущая конформация AE1 определяет или, по крайней мере, влияет на форму клеток в соответствии с теорией бислойной пары (Sheetz, Singer, 1974). Нужно отметить, однако, что две приведенные модели

являются взаимно противоречивыми, поскольку согласно одной из них (Gimsa, Ried, 1995) переход транспортеров во внешнюю конформацию E_0 должен приводить к эхиноцитозу, тогда как согласно другой (Wong, 1999) такая конформация приводит к разворачиванию цепей спектрина и увеличению их внутренней поверхностной площади, что ведет к стоматоцитозу. В любом случае, ни одна из моделей напрямую не может объяснить факта время-зависимых морфологических преобразований, которые наблюдаются в сахарозной среде. С точки зрения первой модели, при введении эритроцитов в неэлектролитную среду с низким содержанием хлора все молекулы AE1 должны перейти в конформацию E_0 , которая должна быть устойчивой, поскольку транспортер в отсутствии субстрата (анионов хлора) не может совершить конформационное преобразование и принять конформацию E_i . Известно, что в этих условиях самообмен хлорида практически полностью ингибирован (Gasbjerg et al., 1996). Зависимость выходящего обменного потока имеет гиперболический вид от концентрации ионов хлора во внешней среде с константой диссоциации порядка нескольких mM, которая, однако, немного различается по данным разных авторов (Gasbjerg, Brahm, 1991; Gunn, Frohlich, 1979; Knauf et al., 1996). Такое рекрутирование внешней конформации белка может хорошо объяснить начальный эхиноцитоз. Если принять за основу предположение, что другие факторы, такие как возможное трансмембранное перераспределение липидов, изменение внеклеточного и внутриклеточного pH и клеточного метаболизма, не являются существенными в данных обстоятельствах, то последующая ретрансформация в сторону дискоцитов и стоматоцитов должна быть связана с время-зависимым переходом части AE1 из конформации E_0 в конформацию E_i . Это согласуется с тем, что ингибитор анионного транспорта DIDS в очень малых концентрациях, которые соответствуют отношению белок/ингибитор 1:1, значительно ингибируют ретрансформацию, хотя и не предотвращают ее (Gimsa, Ried, 1995). Мы подтвердили этот факт и для других ингибиторов – DNDS и SITS (Руденко и др., 2007б). Ингибиторы анионного транспорта имеют предпочтение связываться больше с внешней конформацией E_0 , чем с E_i (Knauf et al., 1989, 2000; Knauf, Spinelli, 1995; Pan, Cherry, 1995), таким образом стабилизируя ее. С другой стороны, предположение о возвращении AE1 в конформацию E_i входит в серьезное противоречие с имеющимися данными по кинетике анионного обмена в эритроцитах. Считается, что топология транспортеров является асимметричной, и в норме количество белков с конформацией E_i в 8–10 раз больше, чем в конформации E_0 (Gunn, Frohlich, 1979; Knauf et al., 1989, 1996, 2002; Liu et al., 1996b). Такое распределение соответствует дискоидной форме эритроцитов и активному функционированию системы Cl^-/HCO_3^- -анионного обмена. Следовательно, восстановление дискоидной формы на фазе 2 предполагает, что распределение конформаций AE1 приняло конфигурацию, соответствующую нативному состоянию. Исходя из этого, в экспериментах по исследованию самообмена анионов следует ожидать серьезного нарушения экспоненциального закона обмена внутриклеточного меченого изотопа соответствующего аниона на внеклеточный. Однако хорошо установлено, что кинетика анионного обмена строго подчиняется этому закону в широком диапазоне концентраций, температур и временных интервалов, что, собственно, и является основой для проведения таких исследований и вычислений потоков анионов (Dalmark, Wieth, 1972; Gasbjerg, Brahm, 1991; Wieth, 1970; Brahm, 1977). В этих экспериментах выходящий поток анионов уменьшается при уменьшении концентрации внеклеточного хлорида. Подобная нелинейность должна быть выражена значительно сильнее в присутствии ингибиторов анионного транспорта, которые задерживают перераспределение между конформациями AE1, однако таких эффектов также не было отмечено (Gasbjerg, Brahm, 1991). Далее, AE1 транспортирует, кроме хлорида и бикарбоната, и другие моновалентные анионы, но с различной скоростью (Dalmark, Wieth, 1972; Brahm, 1977; Dalmark, 1976), которая значительно различается в зависимости от типа аниона. Вследствие этого они являются также конкурентными ингибиторами транспорта хлорида (Dalmark, Wieth, 1972; Liu et al., 1996a; Knauf, Spinelli, 1995; Dalmark, 1976) и, по идее, должны по-разному влиять на МО в ситуации, когда внеклеточный хлорид замещается на другой анион. Наши данные, однако, показывают, что влияние всех анионов, кроме йодида, очень близко друг к другу как по характеру влияния, так и по количественным характеристикам, определяемым по кажущимся константам диссоциации в отношении разных фаз МО. Это показывает, что для МО важен сам факт наличия аниона в соответствующей концентрации, а не его тип, что плохо согласуется с различными скоростями транспорта этих анионов и их разной аффинностью к транспортному сайту (Dalmark, Wieth, 1972; Liu et al., 1996a; Dalmark, 1976; Galanter, Labotka, 1991). Кроме этого, мы видели, что как присутствие анионов в среде, так и их добавление на максимуме ИФ (рис. 2, 3, 4) приводит к концентрационно-зависимому ингибированию МО. В первом случае это можно объяснить тем, что достаточное количество анионов препятствует переходу транспортера в конфигурацию E_0 , и форма клеток, следовательно, не изменяется. Во втором случае анионы добавляли в момент, когда распределение конфигураций белка снова приняло исходное, нативное состояние, и поэтому добавление анионов фиксирует его, но в этом случае должен был бы

наблюдаться большой обменный поток. Следуя этой логике, фазу 3 нужно рассматривать как дальнейшее увеличение количества AE1 в конформации E_i, а фазу восстановления ИФ после добавления аниона через 150 с, т.е. в конце фазы 3, как обратный переход избыточного числа белков, находящихся в конформации E_i, в E₀. Естественно, следует ожидать, что чем больше AE1 перешло в E_i, что соответствует большей степени стоматоцитоза и меньшему значению ИФ, тем больше времени понадобится для восстановления формы в стационарное состояние, соответствующее данной концентрации аниона. Этого, однако, не происходит, поскольку кривая зависимости ИФ от времени после добавления аниона оставалась одинаковой как при добавлении аниона через 150 с (рис. 5), так и через 75, 300 и 450 с (данные не приведены). Важно также подчеркнуть, что восстановление ИФ является значительно более медленным процессом по сравнению с фазами 1 и 2, что непонятно, если учитывать, что изменение конформации AE1 при удалении и добавлении субстрата должно происходить очень быстро, как на фазе 1. Такие же медленные изменения ИФ происходят при аналогичном добавлении ингибитора ионного транспорта DIDS (Руденко и др., 2007б), однако в физиологическом растворе этот агент вызывает изменение формы клеток значительно быстрее (Руденко, Важди Кхалаф, 2006). Таким образом, текущие представления о функционировании анионного обмена и полученные экспериментальные данные плохо согласуются с предположением, что фазы 2 и 3 МО обусловлены постепенным переходом транспортера из конформации E₀ в E_i и, следовательно, ингибирование анионного обмена при понижении концентрации анионов в среде и сопутствующие этому процессу конформационные переходы в молекуле AE1 не имеют непосредственного отношения к форме эритроцитов. Этот вывод также ставит под сомнение и исходное предположение, что начальный эхиноцитоз эритроцитов в среде с низкой концентрацией ионов хлора обусловлен переходом всех AE1 в конформацию E₀. Возможно, что оба эти процесса протекают одновременно, но причинно не связаны друг с другом, или связь не является столь прямой.

Известно, что уменьшение концентрации хлорида в неэлектролитной среде приводит к увеличению проницаемости мембраны для катионов K⁺, Na⁺, Rb⁺ (Bernhardt et al., 1987; Jones, Knauf, 1985; Sambasivarao et al., 1986) и увеличению нетто-потока хлоридов и других моновалентных анионов (Frohlich et al., 1983; Jones, Knauf, 1985; Frohlich, 1984). Интересно, что концентрация внеклеточного хлорида, при которой выходящий нетто-поток хлорида уменьшался в 2 раза (3 мМ) (Frohlich et al., 1983; Frohlich, 1984), фактически совпадает с константой диссоциации для обменного потока и полученными нами значениями на основе измерений ИФ. Это может свидетельствовать, что МО связан не с обменными потоками анионов, а с нетто-потоками, которые также ингибируются ингибиторами анионного транспорта и, как предполагается, осуществляются с помощью AE1, который в данном случае выступает как низкоселективный канал для анионов и катионов (Jones, Knauf, 1985). Кроме этого, в приведенных выше условиях активируются еще несколько транспортных механизмов, таких как неселективный потенциал-зависимый канал (Bennekou et al., 2004, 2006), K/Na/H обменник (Bernhardt et al., 1999) и обмен внутриклеточного Cl⁻ на внеклеточный OH⁻, что приводит к выходу из клетки KCl и уменьшению ее объема (Bisognano et al., 1993). Показано, что связывание AE1 с субстратами или ингибиторами анионного транспорта приводит к крупномасштабным изменениям в его конформации (Knauf et al., 2004). По аналогии с этим, можно предположить, что изменения в транспортной функции других систем, которые также имеют в своей основе функционирование каналов или переносчиков, также могут приводить к изменению их конформации и опосредованно влиять на площадь поверхности внутреннего или внешнего монослоя мембраны. Не исключено, что наблюдаемый МО является отражением суперпозиции конформационных превращений различных транспортных белков, ответственных за различные транспортные системы, которые одновременно активируются в условиях низкой ионной силы среды.

Список литературы

- Руденко С.В., Важди Кхалаф Жамиль Маданат Влияние модификаторов на кинетику формотрансформации эритроцитов // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – Вип.2. – С. 292–295.
- Руденко С.В., Кроуф Дж.Х., Таблин Ф. Изменение формы эритроцитов в зависимости от времени // Биохимия. – 1998. – Т.63, №12. – С. 46–55.
- Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. I. Влияние альбумина // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2007а. – №768, вип.5. – С. 150–156.
- Руденко С.В., Мухамед Хани Румиех, Бондаренко В.А. Морфологическая реакция эритроцитов на изменение электролитного состава среды. II. Влияние ингибиторов анионного транспорта // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Біофізичний вісник. – 2007б. – Вип.1 (18). – С. 53–60.

- Bennekou P., Barksman T.L., Christophersen P., Kristensen B.I. The human red cell voltage-dependent cation channel. Part III: Distribution homogeneity and pH dependence // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2006. – Vol.36 (1). – P. 10–14.
- Bennekou P., Barksman T.L., Kristensen B.I. et al. Pharmacology of the human red cell voltage-dependent cation channel. Part II: inactivation and blocking // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2004. – Vol.33 (3). – P. 356–361.
- Bernhardt I., Bogdanova A.Y., Kummerow D. et al. Characterization of the $K^+(Na^+)/H^+$ monovalent cation exchanger in the human red blood cell membrane: effects of transport inhibitors // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – Vol.18 (2). – P. 119–137.
- Bernhardt I., Erdmann A., Vogel R., Glaser R. Factors involved in the increase of K^+ efflux of erythrocytes in low chloride media // *Biomed. Biochim. Acta.* – 1987. – Vol.46 (2–3). – S36–S40.
- Betz T., Bakowsky U., Muller M.R. et al. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells // *Bioelectrochemistry.* – 2007. – Vol.70. – P. 122–126.
- Bisognano J.D., Dix J.A., Pratap P.R. et al. Proton (or hydroxide) fluxes and the biphasic osmotic response of human red blood cells // *J. Gen. Physiol.* – 1993. – Vol.102 (1). – P. 99–123.
- Brahm J. Temperature-dependent changes of chloride transport kinetics in human red cells // *J. Gen. Physiol.* – 1977. – Vol.70 (3). – P. 283–306.
- Chapman B.E., Kuchel P.W. Fluoride transmembrane exchange in human erythrocytes measured with ^{19}F NMR magnetization transfer // *Eur. Biophys. J.* – 1990. – Vol.19 (1). – P. 41–45.
- Dalmark M. Effects of halides and bicarbonate on chloride transport in human red blood cells // *J. Gen. Physiol.* – 1976. – Vol.67 (2). – P. 223–234.
- Dalmark M., Wieth J.O. Temperature dependence of chloride, bromide, iodide, thiocyanate and salicylate transport in human red cells // *J. Physiol.* – 1972. – Vol.224 (3). – P. 583–610.
- Frohlich O. Relative contributions of the slippage and tunneling mechanisms to anion net efflux from human erythrocytes // *J. Gen. Physiol.* – 1984. – Vol.84 (6). – P. 877–893.
- Frohlich O., Leibson C., Gunn R.B. Chloride net efflux from intact erythrocytes under slippage conditions. Evidence for a positive charge on the anion binding/transport site // *J. Gen. Physiol.* – 1983. – Vol.81 (1). – P. 127–152.
- Galanter W.L., Labotka R.J. The binding of nitrate to the human anion exchange protein (AE1) studied with ^{14}N nuclear magnetic resonance // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol.1079 (2). – P. 146–151.
- Gasbjerg P.K., Brahm J. Kinetics of bicarbonate and chloride transport in human red cell membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1991. – Vol.97 (2). – P. 321–349.
- Gasbjerg P.K., Knauf P.A., Brahm J. Kinetics of bicarbonate transport in human red blood cell membranes at body temperature // *J. Gen. Physiol.* – 1996. – Vol.108 (6). – P. 565–575.
- Gimsa J., Ried C. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? // *Mol. Membr. Biol.* – 1995. – Vol.12 (3). – P. 247–254.
- Greco F.A., Solomon A.K. Kinetics of chloride-bicarbonate exchange across the human red blood cell membrane // *J. Membr. Biol.* – 1997. – Vol.159 (3). – P. 197–208.
- Gunn R.B., Frohlich O. Asymmetry in the mechanism for anion exchange in human red blood cell membranes. Evidence for reciprocating sites that react with one transported anion at a time // *J. Gen. Physiol.* – 1979. – Vol.74 (3). – P. 351–374.
- Jones G.S., Knauf P.A. Mechanism of the increase in cation permeability of human erythrocytes in low-chloride media. Involvement of the anion transport protein capnophorin // *J. Gen. Physiol.* – 1985. – Vol.86 (5). – P. 721–738.
- Knauf P.A., Gasbjerg P.K., Brahm J. The asymmetry of chloride transport at 38 degrees C in human red blood cell membranes // *J. Gen. Physiol.* – 1996. – Vol.108 (6). – P. 577–589.
- Knauf P.A., Law F.Y., Leung T.W. et al. Substrate-dependent reversal of anion transport site orientation in the human red blood cell anion-exchange protein, AE1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol.99 (16). – P. 10861–10864.
- Knauf P.A., Law F.Y., Leung T.W., Atherton S.J. Relocation of the disulfonic stilbene sites of AE1 (band 3) on the basis of fluorescence energy transfer measurements // *Biochemistry.* – 2004. – Vol.43 (38). – P. 11917–11931.
- Knauf P.A., Law F.Y., Marchant P.J. Relationship of net chloride flow across the human erythrocyte membrane to the anion exchange mechanism // *J. Gen. Physiol.* – 1983. – Vol.81 (1). – P. 95–126.
- Knauf P.A., Raha N.M., Spinelli L.J. The noncompetitive inhibitor WW781 senses changes in erythrocyte anion exchanger (AE1) transport site conformation and substrate binding // *J. Gen. Physiol.* – 2000. – Vol.115 (2). – P. 159–173.
- Knauf P.A., Spinelli L.J. NIP- and NAP-aurine bind to external modifier site of AE1 (band 3), at which iodide inhibits anion exchange // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol.269 (2 Pt 1). – C410–C416.

- Knauf P.A., Spinelli L.J., Mann N.A. Flufenamic acid senses conformation and asymmetry of human erythrocyte band 3 anion transport protein // *Am. J. Physiol.* – 1989. – Vol.257 (2 Pt 1). – C277–C289.
- Liu D., Kennedy S.D., Knauf P.A. Source of transport site asymmetry in the band 3 anion exchange protein determined by NMR measurements of external Cl⁻ affinity // *Biochemistry.* – 1996b. – Vol.35 (48). – P. 15228–15235.
- Liu S.Q., Law F.Y., Knauf P.A. Effects of external pH on substrate binding and on the inward chloride translocation rate constant of band 3 // *J. Gen. Physiol.* – 1996a. – Vol.107 (2). – P. 271–291.
- Pan R.J., Cherry R.J. Evidence that eosin-5-maleimide binds close to the anion transport site of human erythrocyte band 3: a fluorescence quenching study // *Biochemistry.* – 1995. – Vol.34 (14). – P. 4880–4888.
- Sambasivarao D., Rao N.M., Sitaramam V. Anomalous permeability and stability characteristics of erythrocytes in non-electrolyte media // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – Vol.857 (1). – P. 48–60.
- Sheetz M.P., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1974. – Vol.71 (11). – P. 4457–4461.
- Wieth J.O. Bicarbonate exchange through the human red cell membrane determined with [14C] bicarbonate // *J. Physiol.* – 1979. – Vol.294. – P. 521–539.
- Wieth J.O. Effect of some monovalent anions on chloride and sulphate permeability of human red cells // *J. Physiol.* – 1970. – Vol.207 (3). – P. 581–609.
- Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte // *J. Theor. Biol.* – 1999. – Vol.196 (3). – P. 343–361.

Представлено: Т.П.Бондаренко / Presented by: T.P.Bondarenko

Рекомендовано до друку: Н.О.Бабенко / Recommended for publishing by: N.A.Babenko

© С.В.Руденко, Л.Ши, В.А.Бондаренко, 2010

© S.V.Rudenko, L.Shi, V.A.Bondarenko, 2010